

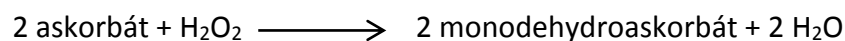
Jméno a UČO:	Datum:
--------------	--------

ÚLOHA A

Analýza izoenzymů askorbát peroxidasy pomocí nativní PAGE

TEORETICKÝ ÚVOD

V rostlinných buňkách je hlavním detoxikačním systémem peroxidu vodíku askorbát-glutathion cyklus, ve kterém hraje klíčovou roli enzym askorbát peroxidasa (APX) katalyzující přeměnu H_2O_2 na vodu za použití askorbátu jako specifického donoru elektronů:



V odlišných částech buňky, jako jsou chloroplasty, mitochondrie, peroxisomy a cytosol, jsou přítomné různé izoformy APX. Exprese jednotlivých genů APX je regulována jak v rámci biotického, tak abiotického stresu a dále poté v rámci vývoje rostlin. Aktivita APX se tak přímo podílí na ochraně rostlinných buněk před nepříznivými environmentálními podmínkami. Vlastní úloha enzymu APX v rámci obranné reakce rostlin je poté podpořena celou řadou výsledků ukazujících nárůst nebo naopak její aktivity v rámci infekce rostliny patogenem. Výrazný pokles její aktivity je poté většinou spojen s nekrózou buněk způsobenou převážně oxidačním stresem.

Využití nativní polyakrylamidové elektroforézy pro stanovování aktivit celé řady enzymů má převážně největší význam při studiu aktivace jednotlivých izoenzymových forem. Sledování aktivity APX je založeno na její schopnosti zabránit askorbát-dependentní redukci nitroblue tetrazolia v přítomnosti H_2O_2 a N,N,N',N'-tetraethylendiaminu (TEMED) na nerozpustný barevný formazan. Výsledná aktivita APX je tak pozorována na gelu jako achromatický proužek. Tato metoda je velmi citlivá a (detekce méně než 0,01 jednotek APX) a specifická pro měření aktivity APX.

POSTUP PRÁCE

Jednotlivé skupiny si rozdělí izolaci z listů po aplikaci neznámých látek a kontrolních listů po aplikaci vody sesbíraných v časových intervalech 0h a 4h po aplikaci.

Izolace askorbát peroxidasy

1. 0,3 g dříve před-drcené rostlinné tkáň smíchejte s 0,6 ml izolačního pufru (100 mM fosfátový pufr (pH=7.0), 5 mM askorbát, 1 mM EDTA) a dobře zvertexujte.
2. Homogenát centrifugujte při 12 000 x g 5 min při 4°C.
3. **Supernatant** přeneste do nové 1.5 ml zkumavky a opět centrifugujte při 20 000 x g 40 min při 4°C.
4. Odsajte supernatant a uchovávejte ho na ledu.

Příprava polyakrylamidového gelu

1. Gel propláchněte vodou, vložte do elektroforetické vany a přilijte elektroforetický pufr obsahující 2 mM askorbát.
2. Spusťte elektroforézu na 30 minut při konstantním proudu 15 mA/gel. Elektroforézu provádějte při 4°C.

Příprava a nanesení vzorků

1. Smíchejte 60 µl enzymového izolátu s 12 µl nanášecího pufru (50% Glycerol, 0.05% Bromfenolová modř).
2. Na gel nanášejte 15 µl jednotlivých izolátů
3. Elektroforézu provádějte při konstantním proudu 15 mA/gel po dobu 2 hodin při 4 °C.

Detekce aktivity askorbát peroxidasy v gelu

Všechny následující kroky budou prováděny při pokojové teplotě.

1. Ekvilibrujte gel 5 minut v 20 ml ekvilibračního pufru I (50 mM fosfátový pufr (pH=7.0), 2mM askorbát).
2. Poté inkubujte gely 10 minut v 20 ml ekvilibračního pufru II, do kterého přidejte 6 µl peroxidu vodíku.
3. Poté gel promyjte 1 minutu v 20 ml promývacího pufru (50 mM fosfátový pufr (pH=7.0)) a ponořte ho do detekčního pufru (50 mM fosfátový pufr (pH=7.8), 28 mM TEMED, 2.45 mM NBT). Aktivita askorbát peroxidasy bude detekována jako achromatický proužek na tmavém pozadí.

VYHODNOCENÍ

- Srovnajte změny aktivity askorbát peroxidasy po aplikaci jednotlivých látek v závislosti na čase.
- Výsledek zdůvodněte.